

# Basal cell carcinoma

Citation for published version (APA):

Brinkhuizen, T. (2016). *Basal cell carcinoma: epigenetics and new treatment modalities, Out of the box*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. <https://doi.org/10.26481/dis.20160624tb>

**Document status and date:**

Published: 01/01/2016

**DOI:**

[10.26481/dis.20160624tb](https://doi.org/10.26481/dis.20160624tb)

**Document Version:**

Publisher's PDF, also known as Version of record

**Please check the document version of this publication:**

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

**General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

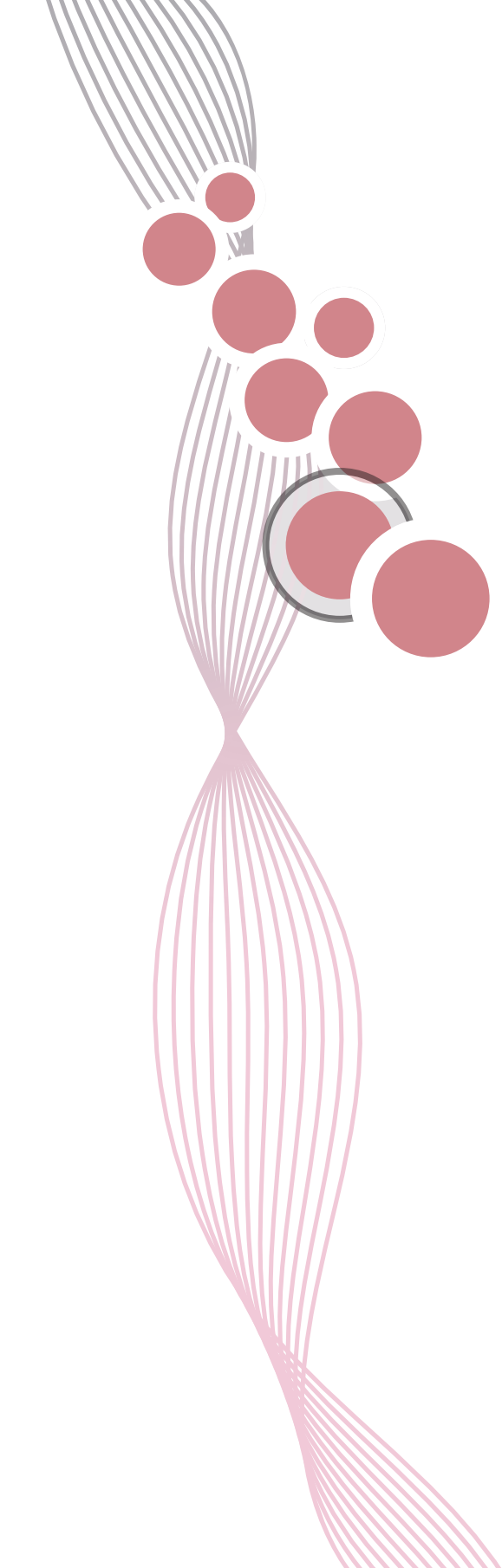
[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

**Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.



# Chapter 7

Summary/Samenvatting

## Summary

A **general introduction** to this thesis is given in **chapter 1**. This chapter provides a brief overview of the current knowledge on basal cell carcinoma (BCC), the most common cancer worldwide, with emphasis on BCC epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis and treatment. The content of this thesis is divided into two parts. **Part one** focuses on the pathogenesis of BCC and the occurrence of epigenetic modifications in particular. New topical and systemic treatments for both non-aggressive BCC (naBCC) and locally advanced BCC (laBCC) are evaluated and described in **part two**. At the end, the aims of this thesis are discussed.

The genetic background of BCC has been studied extensively, while its epigenetic makeup has received comparatively little attention. Epigenetic modifications are hereditary alterations by mechanisms other than changes in the DNA sequence, of which DNA methylation is the most widely studied. These epigenetic alterations are thought to occur at least as frequent as genetic mutations in the development of cancer by silencing of crucial tumor suppressor genes. We hypothesized that DNA-methylation might also contribute to BCC tumorigenesis and could even affect gene expression (**part one**).

In a first exploratory study (**chapter 2.1**), we analyzed the promoter methylation status of ten candidate (tumor suppressor) genes that are associated with Sonic Hedgehog (SHH) signaling, WNT signaling and tumor growth. Methylation-specific PCR (MSP) was used in a large series of 112 BCCs and 124 healthy control samples. We found significantly more methylation in BCCs vs. healthy skin samples for the following gene promoters: *SHH*, adenomatous polyposis coli (*APC*), secreted frizzled-related protein 5 (*SFRP5*) and Ras association domain family 1A (*RASSF1A*). As promoter methylation may result in gene silencing, we performed reverse transcription and quantitative reverse transcription PCR (RT-PCR), which showed reduced mRNA levels of these four genes for APC and SFRP5 in BCCs (n=6) vs. normal skin (n=6). Significant down regulation of SHH, APC and RASSF1A could be confirmed on protein level as well by immunohistochemical staining. Increased canonical WNT activity was visualized by  $\beta$ -catenin staining, showing nuclear  $\beta$ -catenin in only 28/101 (27.7%) of BCC. Absence of nuclear  $\beta$ -catenin in the majority of the samples may be due to high levels of membranous E-cadherin (in 94.1% of the samples). We detected no considerable changes in methylation status between sun-protected and sun-exposed skin, suggesting that the methylation pattern we detected is tumor, rather than locus or patient-specific. In conclusion, we provide evidence suggesting promoter hypermethylation-mediated silencing of key players within the SHH and WNT pathways is frequent in BCCs, which is consistent with their known constitutive activation in BCCs. However, as BCCs are highly heterogeneous, it seems likely that aberrant epigenetic regulation of additional genes could contribute to BCCs development. With MSP it is possible to analyze predefined genes only. Therefore, in **chapter 2.2**, we performed genome-wide methylated DNA enrichment sequencing (MethylCap-seq) on 5 sporadic BCC and 5 healthy skin samples. These results were integrated with genome wide RNA-sequence data (RNA-seq henceforth), constituting the functional methylome. Fifteen differentially methylated or expressed loci in the BCC

samples were identified, among which *PTCH1* (part of SHH pathway), *PTPRN2* (methylation marker in squamous lung cell carcinoma and *IFI30* (playing a critical immunoregulatory role in melanoma). To further place the RNA expression patterns in a functional context, we performed pathway analysis of the RNA-seq data with a SPIA software tool. This *in silico* pathway analysis firmly implicated cytokine signaling, chemokine signaling and Toll-like receptor signaling in BCC growth and pathway activity, which we confirmed with immunohistochemical staining. Thus, we identified significant epigenetic modulation of gene expression in BCC and uncovered immunomodulatory signaling as a driver in BCC development.

In **chapter 2.3** we compared the MethylCap-seq and RNA-seq data acquired in **chapter 2.2** with those of a laBCC. This comparison provides the first evidence that there are substantial differences in gene methylation and expression levels between laBCC and naBCC. We found a significantly higher level of MMP13 expression in laBCC. This finding might explain why laBCC are much more aggressive than naBCC, because MMP13 is an enzyme that degrades extracellular matrix and bone. We also suggest that MMP13 might be used as a biomarker to distinguish BCC that are potentially aggressive and should be treated and followed up more rigorously to prevent local recurrence or evolution into a laBCC.

In our attempts to gain better insight into BCC pathogenesis, we realized that thinking 'out of the box' is crucial. As hair follicles are hypoxic microenvironments and BCCs are considered hair follicle tumors, we hypothesized that hypoxia-induced signaling pathways could be involved in BCCs as they are in other human malignancies. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF1) and mechanistic/mammalian target of rapamycin (mTOR) are key players in the hypoxia pathways. In addition, the differentiation between BCCs and trichoepitheliomas (TEs), benign neoplasms that strongly resemble BCC, can be hard. Therefore we decided to compare these two tumors in **chapter 3.1**. We used immunohistochemical staining of formalin-fixed paraffin-embedded BCCs (n=45) and TEs (n=35) samples to assess activity of HIF1, mTORC1 and their most important target genes. Among the 45 BCCs and 35 TEs examined, most expression levels of several HIF1a and mTORC1 targets were comparable between BCCs and TEs. However, CAIX, Glut1 and PHD2 expression levels were significantly higher in TEs when only samples with at least 80% expression were included. From these results we concluded that HIF and mTORC1 signaling seems active in both BCCs and TEs. However, there are no appreciable differences between the two with respect to pathway activity. At this moment immunohistochemical analyses of HIF, mTORC1 and their target genes does not provide a reliable diagnostic tool for the discrimination of BCCs and TEs.

Current cancer research focuses ever more on the development of targeted treatments that specifically suppress key signaling pathways, as opposed to the more generally used nonspecific cytotoxic agents. **Part two** of this thesis provides novel insights in the usefulness of both topical and systemic targeted treatments in naBCCs and laBCCs respectively.

Non-invasive treatments for low risk BCCs have several advantages over conventional surgical excision, such as lower healthcare costs, a decrease in the workload for dermatologists, a better cosmetic outcome and a higher patient preference. Photodynamic therapy (PDT) (photochemical), imiquimod (immune-modulating) and 5-fluorouracil cream (chemotherapeutic) are available non-invasive treatments for low risk BCC that are well studied and already frequently prescribed. Apart from imiquimod, however, they all seem to have a mode of action of targeting non-specific signaling pathways activated in BCC. We hypothesized that higher efficacy might be expected when signaling pathways activated in BCC are specifically targeted, herewith potentially reaching efficacy rates of surgical excision. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and vitamin D derivatives such as calcitriol can interfere in the SHH and WNT pathways, as well as in apoptosis signaling. From this, we hypothesized in **chapter 4.1** that topically applied diclofenac sodium 3% gel (Solaraze®), calcitriol 3µg/g ointment (Silkis®) and a combination of both would result in a decrease in proliferation and an increase in apoptosis in superficial (sBCCs) and nodular (nBCCs). In a phase II, single blind, randomized controlled intervention trial, patients with a primary, histologically proven sBCC (n=64) or nBCC (n=64) were randomly assigned to receive either topical diclofenac, calcitriol, a combination of both or no topical treatment (control group). For eight weeks, patients applied the vehicle twice a day and covered it with an occlusive sheet. At the end of the treatment period, all tumors were excised and histologically examined. The primary outcome measure was the post-treatment expression of Ki-67 (proliferation marker) and Bcl-2 (apoptosis marker). Histological clearance, adverse events, application-site reactions, patient compliance and patient satisfaction were secondary outcomes. We were able to confirm a significant decrease in Ki-67 and Bcl-2 expression in sBCCs treated with diclofenac and for Ki-67 after combination therapy. In addition, we found complete histological tumor regression in 64.3% of sBCCs after diclofenac and 43.8% of sBCCs after combination therapy, compared to 0.0% of controls. We found no tumor regression in nBCCs, and no appreciable changes in either Ki-67 or Bcl-2 expression levels, probably due to insufficient penetration of the drugs at the tumor site. Application-site reactions were reported frequently in the diclofenac groups, though most reactions were of mild to moderate severity and similar as seen in other non-invasive therapies for sBCCs, such as imiquimod and 5-fluorouracil cream. Repetitive occlusion as used in our trial may have enhanced the severity of the skin reactions. Despite the side effects, the compliance was high, ranging from 91.82% to 98.18%. From our results we conclude that, although surgical excision remains the gold standard for all BCCs, topical diclofenac may be a promising new treatment for low risk sBCCs. Because of its different mode of action by targeting several molecular pathways activated in BCCs, the expected major benefit of diclofenac gel is that is effective in BCC's non-responsive to non-specific or SHH-targeting agents. Additionally, as simultaneously targeting SHH and other signaling pathways may have a synergistic effect, we speculate that combining diclofenac with imiquimod (currently the most effective non-invasive treatment in sBCCs) might be promising.

Immunohistochemical (IHC) analysis as assessed in **chapter 4.1** is being used more often to gain insight in the underlying mode of action or efficacy of new, targeted therapies for BCCs. Manual pathologist-based quantification (MQ) is still the gold standard in the assessment of IHC slides, however, it is time-consuming and labor-intensive as well as subject to high intra- and inter-observer variability. Digital image analysis techniques offer an objective approach with a high sensitivity for change and are expected to have an increased reproducibility. However, comparative studies that test the assumption of high reproducibility of digital BCC image analyses are lacking. In **chapter 4.2** we used semi-automated quantification (SAQ) for the evaluation of 122 sBCCs and nBCCs and found reasonable high inter-observer agreements with 95% limits of agreement between -9.2% and 10.8% for Ki-67 and between -12.2% and 20.0% for Bcl-2. Two trained, but previously inexperienced, investigators performed SAQ independently. However, large discrepancies were seen between SAQ and MQ (performed by one experienced dermato-pathologist), especially at higher expression levels (more than 20% positive tumor cells) of Ki-67 and Bcl-2, which could partly be explained by systematic error. Our findings point to the need for a further study wherein consensus evaluation by more than one pathologist will be compared with SAQ measurements.

When naBCC are neglected or inadequately treated, they have the potential to develop into a laBCC. In 2012, the U.S Food and drug administration (FDA) approved vismodegib, an orally active synthetic SMO inhibitor, for the treatment of laBCC and mBCC. However, primary (no initial response to treatment) or secondary/acquired resistance (progression after an initial response) are emerging problems. **Chapter 5.1** describes a 68-year old woman with a laBCC of the left shoulder who developed tumor regrowth 20 weeks after an initially good response to vismodegib. Mutation analysis of *PTCH1* and *SMO* was performed on primary tumor tissue as well as on clinically responsive skin and tumors that arose during treatment. *PTCH1* mutations were found in the primary tumor and in two newly developed tumor nodules, while they were absent in clinically and histologically responding tissue. This finding implies that cells from the original tumor had survived. Additionally, the recurrent tumor nodules harbored two SMO mutations (p.Trp281Leu and p.Val321Met) which were neither found in the primary BCC nor in the responding skin. Thus, even though the resistant tumors arose from the same, primary tumor, they were not clonal. Both SMO mutations may probably cause resistance for SMO inhibitors. Currently, classification of resistance as being primary or secondary is based on clinical characteristics. A patient with presumably primary resistance to vismodegib is discussed in **chapter 5.2**. A 52-year old man was treated with vismodegib for a recurrent BCC of the nose and right cheek, that had previously been inadequately treated. After 7 weeks of treatment, hyperkeratosis had increased and comedo-like lesions had developed on the nose. No improvement was observed and a transition into a squamous cell carcinoma (SCC) was feared. The Sequential skin biopsies showed epidermal cysts, but no residual BCC or newly formed SCC. Because of the possibility of a sample error, Mohs' micrographic surgery was performed, showing infiltrative BCC but no SCC, which was confirmed by immunohistochemical stains for Ber-Ep4. Formation of pseudocyst-like structures and SCC within the initial BCC following vismodegib treatment has been reported previously in limited cases only. Also, the development of SCC and keratoacanthoma on other body

sites has been described in literature. It is therefore important to be aware of the possibility of occurrence of SCC during vismodegib treatment. Sequential mutation analysis on pre-treatment and recurrent tumor tissue may be helpful to anticipate on the resistance (either primary or secondary) in order to actively alter therapy. Accordingly, treatment schedules and combination therapies can be customized to both patient and tumor characteristics.

## Samenvatting

In het **eerste hoofdstuk** wordt een **algemene inleiding** tot dit proefschrift gegeven. Het hoofdstuk schetst in het kort de huidige kennis van het basaalcelcarcinoom (BCC), wereldwijd de meest voorkomende vorm van kanker. De nadruk ligt hierbij op epidemiologie, pathogenese, klinische presentatie, diagnose en behandeling. Inhoudelijk bestaat dit proefschrift uit twee delen. Het **eerste deel** is gericht op de pathogenese van BCC, en dan met name op de epigenetische modificaties. In het **tweede deel** worden nieuwe topicale en systemische behandelingen voor zowel niet-agressieve (naBCC) als lokaal agressieve BCC (laBCC) besproken en geëvalueerd. Tot slot worden de doelstellingen van dit proefschrift beschreven.

De genetische achtergrond van BCC is uitvoerig onderzocht, maar aan de epigenetische achtergrond is verhoudingsgewijs minder aandacht besteed. Epigenetische modificaties zijn erfelijk bepaald door andere mechanismen dan veranderingen in de DNA sequentie, waarvan DNA methylering het meest onderzocht is. Verondersteld wordt dat deze epigenetische veranderingen minstens zo vaak optreden bij de ontwikkeling van kanker als genetische mutaties, dit door inactivatie van cruciale tumorsuppressorgenen. Onze hypothese is dat DNA-methylering mogelijk ook bijdraagt aan de tumorgenese van het BCC en zelfs de genexpressie kan beïnvloeden (**deel 1**).

In een eerste experimentele studie (**hoofdstuk 2.1**) hebben we de promotor methyleringsstatus van tien kandidaat (tumorsuppressor) genen geanalyseerd. Deze genen zijn geassocieerd met de Sonic Hedgehog (SHH) signalering, de WNT signaaltransductieroute en tumorgroei. Er is gebruikgemaakt van methylering-specifieke PCR (MSP) bij de analyse van 112 BCC's en 124 gezonde controlemonsters. In de volgende promotorgenen is er significant meer methylering gevonden in BCC's dan in de gezonde controlegroep: *SHH*, adenomateuze polyposis coli (*APC*), gesecreteerde frizzled gerelateerd eiwit 5 (*SFRP5*) en Ras geassocieerde domein familie 1A (*RASSF1A*). We hebben een reverse transcriptie en kwantitatieve reverse transcriptie PCR (RT-PCR) uitgevoerd omdat methylering van een promotor kan leiden tot inactivatie van een gen. Van de hiervoor genoemde vier genen werd er in APC en SFRP5 een verminderde concentratie mRNA in BCC's (n=6) gezien ten opzichte van normale huid (n=6). Een significante downregulatie van SHH, APC en RASSF1A zou bevestigd kunnen worden zowel op eiwitniveau als door middel van immunohistochemische kleuringen. Door aankleuring van  $\beta$ -catenine werd in slechts 28/101 (27,7%) van de BCC's verhoogde canonieke WNT-activiteit zichtbaar. Nucleair  $\beta$ -catenine was in de meerderheid van de samples afwezig; dit kan te verklaren zijn door de hoge concentraties membraanous E-cadherine (94,1% van de samples). We hebben geen noemenswaardige veranderingen in het methyleringspatroon tussen de aan zon blootgestelde huid en de voor zon beschermde huid gevonden. Dit suggereert dat het vastgestelde methyleringspatroon eerder bij een tumor past dan dat het locus- en patiëntspecifiek is. We leveren dus bewijs aan dat doet vermoeden dat inactivatie van hoofdrolspelers in de SHH en WNT signaaltransductieroutes door middel van hypermethylering van een promotor frequent voorkomt in BCC's. Dit komt overeen met de reeds bekende constitutieve activatie van deze signaaltransductieroutes in



BCC's. BCC's zijn echter zeer heterogeen, waardoor het waarschijnlijk lijkt dat een abnormale epigenetische regulatie van additionele genen kan bijdragen aan de ontwikkeling van BCC's. Met behulp van MSP is het alleen mogelijk om vooraf bepaalde genen te analyseren. In **hoofdstuk 2.2** hebben we dan ook gekeken naar genomwijde 'methylated DNA enrichment sequencing' (MethylCap-seq) op vijf sporadische BCC's en op vijf gezonde huidmonsters. Deze resultaten zijn geïntegreerd met genomwijde RNA-sequentie data (RNA-seq) die het functionele methyloom vormen. Er zijn vijftien differentieel gemethyleerde of tot expressie gebrachte loci in de BCC-monsters geïdentificeerd, waaronder *PTCH1* (deel van de SHH signaaltransductie), *PTPRN2* (methylering marker in plaveiselcelcarcinoom van de long) en *IFI30* (speelt een cruciale rol in de immunoregulatie van melanomen). Om de RNA expressiepatronen in een functionele context te kunnen plaatsen, hebben we met de SPIA software de signaaltransductieroutes van de RNA-seq data geanalyseerd. Deze *in silico* signaaltransductierouteanalyse liet duidelijk cytokine signalering, chemokine signalering en Toll-like receptor signalering zien in BCC-groei en signaaltransductieactiviteit. Dit laatste hebben wij door middel van immunohistochemische kleuringen bevestigd. We hebben dus significante epigenetische modulatie van genexpressie in BCC geïdentificeerd en ontdekt dat de immunomodulerende signalering een aanjager is in de ontwikkeling van BCC's.

In **hoofdstuk 2.3** hebben we de verkregen MethylCap-seq en RNA-seq data uit **hoofdstuk 2.2** vergeleken met die van een laBCC. Deze vergelijking levert het eerste bewijs dat er substantieel verschil is in de hoeveelheid gen methylering en expressie tussen laBCC en naBCC. We hebben een significant hogere concentratie MMP13 expressie gevonden in laBCC. Deze bevinding zou kunnen verklaren waarom laBCC een veel agressievere vorm is dan naBCC. MMP13 is namelijk een enzym dat de extracellulaire matrix en het bot afbreekt. Wij suggereren dat MMP13 als biomarker gebruikt zou kunnen worden om in potentie agressieve BCC's te herkennen. Op deze BCC's zouden dan een rigoureuzere behandeling en follow-up kunnen worden toegepast om een lokaal recidief of de ontwikkeling tot een laBCC te voorkomen.

Bij onze pogingen om meer inzicht te krijgen in de pathogenese van het BCC hebben we ons gerealiseerd dat 'out of the box' denken van cruciaal belang is. Een haarfollikel is een hypoxisch micromilieu en er wordt gedacht dat BCC's haarfollikeltumoren zijn. Onze hypothese is dan ook dat door hypoxie geïnduceerde signaaltransductieroutes een rol kunnen spelen bij BCC's. De activiteit van deze signaaltransductieroutes wordt ook in andere humane carcinomen gezien. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) en mechanistic/mammalian target of rapamycin (mTOR) zijn hoofdrolspelers in de hypoxische signaaltransductieroutes. Het onderscheid tussen BCC en een trichoepitheliom (TE), een goedaardige tumor die veel op het BCC lijkt, kan moeilijk zijn. In **hoofdstuk 3.1** hebben we daarom deze twee tumoren met elkaar vergeleken. We hebben immunohistochemische kleuringen gebruikt om de activiteit van HIF1, mTORC1 en hun belangrijkste doelgenen aan te tonen op formaline gefixeerde paraffine preparaten van BCC (n=45) en TE (n=35). De meeste expressieniveaus van de verschillende HIF1a en mTORC1 targets zijn vergelijkbaar tussen de onderzochte 45 BCC's en 35 TE's. Als alleen samples met een expressie van

tenminste 80% worden meegerekend, is in de TE's de expressie van CAIX, Glut1 en PHD2 significant hoger. Hieruit kunnen we concluderen dat HIF en mTORC1 signalering in zowel BCC's als TE's actief is. Er zijn echter geen noemenswaardige verschillen gevonden tussen de twee groepen ten aanzien van de activiteit van de signaaltransductieroute. Op dit moment lijken de immunohistochemische analyses van HIF, mTORC1 en hun doelgenen geen zinvol diagnosticum voor het onderscheid tussen BCC 's en TE's.

De huidige onderzoeken naar kanker richten zich steeds meer op de ontwikkeling van doelgerichte behandelingen, die specifieke hoofdrolspelers van een signaaltransductieroute onderdrukken, in tegenstelling tot de huidige meer generieke en niet-specifieke cytotoxische middelen. In **deel 2** van dit proefschrift wordt nader ingegaan op de bruikbaarheid van zowel systemische als topicale doelgerichte behandelingen in respectievelijk naBCC en laBCC.

Non-invasieve behandelmethoden voor BCC's met een laag risico hebben verschillende voordelen boven conventionele chirurgische excisie: lagere kosten, daling van de werkdruk voor dermatologen, een beter cosmetisch resultaat en een hogere patiënttevredenheid. Photodynamische therapie (PDT) (fotochemisch), imiquimod (immuunmodulerend) en 5-fluorouracil crème (cytostaticum) zijn goed onderzochte en reeds vaak voorgeschreven non-invasieve behandelopties voor weinig risicovolle BCC's. Op imiquimod na, lijken ze allemaal aan te grijpen op niet-specifieke signaaltransductieroutes die geactiveerd zijn in BCC. Onze hypothese is dat er een hogere effectiviteit van topicale behandelingen bereikt kan worden, als de topicale middelen specifiek op de geactiveerde signaaltransductieroutes van BCC aangrijpen. Op deze manier kan mogelijk de effectiviteit van chirurgische ingreep worden benaderd. Niet-steroïde ontstekingsremmers (NSAID's) en vitamine D-derivaten, zoals calcitriol, kunnen interfereren met de SHH, WNT en apoptose signaaltransductieroutes. Op basis hiervan is onze hypothese in **hoofdstuk 4.1** dat topicale diclofenac sodium 3% gel (Solaraze®), calcitriol 3µg/g crème (Silkis®) en een combinatie van beide leiden tot een daling van de proliferatie en een stijging van de apoptose in superficiële BCC (sBCC) en nodulaire BCC (nBCC). In een fase II, geblindeerd, gerandomiseerd en gecontroleerd onderzoek werden patiënten met een primair, histologisch bevestigd sBCC (n=64) of nBCC (n=64) gerandomiseerd in ofwel topicale diclofenac, calcitriol of een combinatie van beide ofwel geen topicale behandeling (controlegroep). Patiënten hebben gedurende acht weken tweemaal daags de crème aangebracht en vervolgens bedekt met afsluitende folie. Aan het eind van de behandelperiode zijn alle tumoren geëxideerd en histologisch onderzocht. De primaire uitkomstmaat was de meting van de expressie van Ki-67 (proliferatiemarker) en Bcl-2 (apoptose marker) na de behandeling. Histologische remissie, bijwerkingen, lokale huidreacties, compliantie en patiënttevredenheid waren secundaire uitkomstmaten. We hebben een significante daling van Ki-67 en Bcl-2 expressie gevonden in sBCC's die behandeld werden met diclofenac. Bij patiënten die behandeld zijn met de combinatietherapie is een significante daling van Ki-67 gevonden. Verder werd volledige histologische regressie van de sBCC's in 64,3% en 43,8% van de patiënten die behandeld werden met respectievelijk diclofenac en de combinatietherapie tegen 0,0% in de controlegroep. Bij de nBCC's hebben we geen tumorregressie en ook geen

noemenswaardige veranderingen in de Ki-67 of Bcl-2 expressie gevonden. Dit is mogelijk te verklaren door onvoldoende penetratie van de medicijnen op de plek van de tumor. Lokale huidreacties kwamen frequent voor in de groepen met diclofenac. De meeste reacties waren mild tot matig van ernst en vergelijkbaar met die van andere non-invasieve behandelingen voor sBCC's, zoals imiquimod en 5-fluorourcil creme. De herhaaldelijke occlusie zoals wij in onze trial hebben gebruikt, heeft mogelijk tot heftiger huidreacties geleid. Ondanks de bijwerkingen was de compliantie hoog, tussen 91,82% en 98,18%. Uit onze resultaten kunnen we concluderen dat, ondanks het feit dat chirurgische excisie voor alle BCC's de gouden standaard blijft, topicale diclofenac een veelbelovende nieuwe behandelmethode kan zijn voor laag risico sBCC's. Diclofenac gel heeft door het andere werkingsmechanisme effect op verschillende in BCC's geactiveerde moleculaire signaaltransductieroutes. Het grote voordeel dat we hiervan verwachten, is dat diclofenac juist effectief is in BCC's die niet reageren op de niet-specifieke behandelingen of de behandelingen die alleen op de SHH-sigtaaltransductie aangrijpen. Als bij een behandeling van BCC's zowel de SHH als andere signaaltransductieroutes het doel zijn, kan dit een synergetisch effect hebben. We speculeren dan ook dat de combinatie van diclofenac met imiquimod (op dit moment de meest effectieve vorm van non-invasieve behandeling in sBCC's) veelbelovend kan zijn.

De immunohistochemische kleuringen (IHK) die in **hoofdstuk 4.1** zijn beoordeeld, worden gebruikt om meer inzicht te krijgen in het onderliggende werkingsmechanisme en de effectiviteit van nieuwe, doelgerichte behandelopties in BCC's. Handmatige kwantificatie (HK) door een patholoog wordt voor de beoordeling van IHK nog steeds als gouden standaard gezien. Dit is echter tijdrovend en arbeidsintensief en heeft een hoge intra- en interobserver variabiliteit. Digitale coupe analysetechnieken bieden een objectieve benadering met hoge sensitiviteit voor verandering en hebben waarschijnlijk een hogere reproduceerbaarheid. Er zijn nog geen vergelijkende studies bekend die deze verwachte reproduceerbaarheid van digitale coupeanalyses voor BCC's bevestigen. In **hoofdstuk 4.2** hebben we 122 sBCC's en nBCC's beoordeeld door middel van semi-automatische kwantificatie (SAK). Hierbij hebben we toereikend hoge interobserver overeenstemming gevonden met 95%-betrouwbaarheidsintervallen tussen -9,2% en 10,8% voor Ki-67 en tussen -12,2% en 20,0% voor Bcl-2. De SAK is onafhankelijk uitgevoerd door twee daartoe opgeleide maar nog onervaren onderzoekers. Hierbij zijn grote discrepanties gezien tussen de SAK en HK (verricht door één ervaren dermato-patholoog), met name bij hogere expressie van Ki-67 en Bcl-2 (meer dan 20% van de tumorcellen is positief). Dit is gedeeltelijk te verklaren door een systematische fout. Onze bevindingen geven aanleiding voor verder onderzoek waarin de HK, die door meer dan één wordt verricht, wordt vergeleken met de uitkomsten van de SAK.

Een naBCC heeft de potentie om zich te ontwikkelen tot een laBCC indien niet of onvoldoende behandeld. In 2012 heeft de Amerikaanse 'Food and drug administration' (FDA) vismodegib, een oraal actieve synthetische SMO inhibitor, goedgekeurd voor de behandeling van laBCC en gemetastaseerd BCC (mBCC). Primaire (geen reactie op de behandeling) en secundaire/verkregen (progressie na initiële respons) resistentie is bij deze behandeling een probleem. In **hoofdstuk 5.1** wordt een casus beschreven van een 68-jarige vrouw met een laBCC op de

linkerschouder. De tumor reageerde initieel goed op vismodegib maar na 20 weken begon deze opnieuw te groeien. Er zijn mutatieanalyses verricht van *PTCH1* en *SMO* op de primaire tumor, de klinisch reagerende huid en de gedurende de behandeling groeiende tumoren. De *PTCH1* mutaties werden gevonden in de primaire tumor en in de twee nieuw ontwikkelde tumornoduli, terwijl de mutatie afwezig was in de klinisch en histologisch reagerende huid. Dit impliceert dat tumorcellen van de oorspronkelijke tumor de behandeling overleefd hebben. Daarnaast werden bij de twee recidief noduli twee *SMO* mutaties (p.Trp281Leu en p.Val321Met) gevonden. Deze mutaties waren niet terug te vinden bij de primaire tumor, noch bij het gereageerde weefsel. Hoewel de resistente tumoren vanuit de primaire tumor groeiden, waren ze er dus geen klonen van. Beide *SMO* mutaties zouden de oorzaak kunnen zijn voor de resistentie voor de *SMO* inhibitors. Op dit moment is de classificatie primaire of secundaire resistentie gebaseerd op het klinische beeld. In **hoofdstuk 5.2** wordt een patiënt besproken met vermoedelijk primaire resistentie voor vismodegib. Bij een 52-jarige man werd een recidief BCC van de neus en rechterwang behandeld met vismodegib, nadat het eerder inadequaat behandeld was. Na een behandelperiode van zeven weken was er een toename van de hyperkeratose te zien en ontwikkelde er zich verruceuze afwijkingen op de neus. Ondanks de behandeling werd er geen verbetering gezien en de angst bestond dat de tumor zich had ontwikkeld tot een plaveiselcelcarcinoom (PCC). In de daaropvolgende biopsieën werden epidermale cysten gezien, maar er waren geen aanwijzingen voor een recidief BCC of nieuw ontwikkeld PCC. Gezien de kans op een steekproeffout werd besloten Mohs' micrografische chirurgie te verrichten. Dit liet een infiltratief BCC maar geen PCC zien. Dit werd door middel van immunohistochemische kleuringen van Ber-Ep4 bevestigd. De ontwikkeling van pseudocysten en PCC binnen het initiële BCC bij behandeling met vismodegib is eerder in slechts een beperkt aantal casus besprekingen beschreven. De ontwikkeling van PCC en keratoacanthomen op andere locaties van het lichaam is ook in de literatuur beschreven. Het is dus belangrijk om alert te zijn op de mogelijke ontwikkeling van een PCC tijdens de behandeling met vismodegib. Sequentiële mutatieanalyses op onbehandeld en recidief tumorweefsel kan zinvol zijn om te anticiperen op resistentie (primaire of secundaire) en actief de behandeling hierop aan te passen. Op deze manier kunnen behandelingschema's en combinatietherapieën worden toegespitst op zowel de patiënt als de tumorkenmerken.